

骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑出血后神经可塑性的影响

单泓 李建斌 刘敏 戚正 王姣杰 韩小改 梁会涛

【摘要】 目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对大鼠脑出血后神经可塑性的影响。方法 利用脑立体定位仪制作大鼠脑出血模型;将120只大鼠随机分成BMSCs移植组、模型组,每组各60只;利用透射电镜观察血肿周围神经组织超微结构及神经突触的变化并应用Simple-PCI图像分析系统,选定测量参数计算突触数量,突触界面曲率,突触后致密区宽度及突触间隙;利用免疫组化技术检测大鼠血肿周围神经组织中神经突触相关蛋白Shank1、Nestin的表达;利用Berderson评分标准对大鼠进行神经功能评价。结果 透射电镜观察,BMSCs移植组脑出血灶周围可见大量新生神经元及神经胶质细胞,神经突触数量为 16.27 ± 2.14 ,神经突触界面曲率为 1.57 ± 0.04 ,突触后致密区为 68.32 ± 10.54 ,突触间隙为 14.65 ± 1.58 ,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。BMSCs移植组及模型组Shank1表达分别为: 75.82 ± 10.65 、 14.33 ± 1.14 ,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$);BMSCs移植组及模型组Nestin阳性细胞表达分别为: 68.87 ± 7.46 、 12.64 ± 0.07 ,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。BMSCs移植组神经功能评分明显降低,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BMSCs可促进大鼠脑出血后神经组织修复,增强神经可塑性,促进神经功能恢复。

【关键词】 脑出血; 间质干细胞; 神经元可塑性

Influence of neuroplasticity of rat cerebral hemorrhage by bone marrow mesenchymal stem cells transplantation SHAN Hong, LI Jian-bin, LIU Min, QI Zheng, WANG Jiao-jie, HAN Xiao-gai, LIANG Hui-tao. The Red Cross Blood Center in Henan Province, Zhengzhou 450000, China
Corresponding author: LI Jian-bin, Email: minyu1983@126.com

【Abstract】 **Objective** To observe the influence of neuroplasticity of hemorrhage in rats after transplantation of marrow mesenchymal stem cell. **Methods** The models were made by brain solid positioner. Rats were randomly divided into BMSCs group and control group. Observe the ultrastructure of nervous tissue and the change of neurosynaptic near hematoma by transmission electron microscope. Study the neurosynaptic quantitatively. The expression of Shank1 and Nestin proteins which were related with synapse were detected by using immunohistochemistry. Evaluate the neural function of rats. **Results** Much new neuron and neurogliaocyte were observed around cerebral hemorrhage in BMSCs group by transmission electron microscope. The number of neurosynaptic increased obviously. The curvature of synaptic boundary magnified and dense area of postsynaptic thicken. The gap of synapse narrowed obviously. Compared with control group, it was statistically significant ($P < 0.01$). The expression of Shank1 protein around cerebral hemorrhage increased in BMSCs group. Compared with control group, it was statistically significant. The expression of Nestin positive cells around cerebral hemorrhage were detected in BMSCs group. There is no Nestin positive cells in control group. The neurological scores of BMSCs group was significantly decreased. Compared with control group, it was statistically significant. **Conclusion** The BMSCs transplantation can repair the nervous tissue, strengthen the plasticity of nerve and promote the recovery of neural function.

【Key word】 Cerebral hemorrhage; Mesenchymal stem cells; Neuronal plasticity

研究表明^[1-2]脑出血后神经功能恢复的根本机制在于脑的可塑性,而可塑性增强与突触数量和功能密

切相关。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于骨髓的干细胞群,具有多向分化的能力,某种条件下BMSCs可分化为神经干细胞^[3]。因此,BMSCs可能具有增强脑出血后神经可塑性的作用。本研究即探讨BMSCs移植对大鼠脑出血后神经功能的影响,为进一步的研究提供依据。

材料与方法

1. 动物分组: 雄性 SD 大鼠 120 只[河南省实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXX (豫) 2010-0002], 体重 280~320 g, 随机分为 BMSCs 移植组和模型组, 每组各 60 只。制备脑出血模型。

2. 主要试剂和仪器: VII型胶原酶(美国 Sigma 公司产品); DAB 染色试剂盒(博士德公司); 透射电子显微镜(HITACHI H-600 型 日本); 脑立体定位仪(NARISHIGE SN-3 型 日本); Simple PCI 图像分析软件等。

3. 模型制备: 大鼠给予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后固定于脑立体定位仪上, 暴露前囟。在前囟后 0.2 mm, 中线右侧旁开 3.0 mm 处钻一小孔暴露硬脑膜, 用微量注射器(1 μ l) 抽吸 0.5 U/ μ l VII型胶原酶 0.25 μ l, 后缓慢进针, 深度为 5.0 mm, 5 min 注射完毕。2 d 后以同样方法向实验组注入已制备好的 BMSCs 悬液, 对照组注入生理盐水。

4. BMSCs 培养: 取健康雄性 SD 大鼠, 处死, 无菌条件下分离股骨, 用 DMEM 培养液冲洗骨髓腔, 收集骨髓冲洗液, 分装在 2 个 50 ml 的培养瓶内, 每瓶加至培养基 5 ml, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养, 48 h 后更换新鲜培养液, 洗去未贴壁的细胞, 倒置显微镜观察细胞生长状况, 待贴壁细胞完全融合后 2.5 g/L 胰酶消化传代, 传到第 4 代时, 将细胞接种到 2 个 6 孔板内, 每孔细胞浓度为 1×10^5 /ml, 达到 80% 共融时每个板加入诱导剂。

5. 神经功能缺损评分: Berderson 评分标准^[4]: 0 分, 无神经损伤; 1 分, 大鼠瘫痪侧前肢屈曲于腹下; 2 分, 除 1 分体征外, 向瘫痪侧推大鼠时阻力降低; 3 分, 出现追尾现象。4 分, 除以上体征外, 大鼠活动减少。大鼠得分在 0~4 分之间。分别在术后 6 h、24 h、3 d、7 d、14 d 对大鼠神经功能进行评分。得分 2~4 分者模型复制成功。选取得分在 2 分以上的模型大鼠用于后续实验。所有 120 只大鼠造模前进行神经功能评分, 均为 0 分。造模后, BMSCs 移植组 60 只大鼠, 56 只评分在 2 分以上, 造模成功率为 93%; 模型组 60 只大鼠, 54 只评分在 2 分以上, 造模成功率为 90%。

6. 电镜标本制作及电镜学分析: 前固定(4 $^{\circ}$ C): 置于 2%戊二醛浸泡。后固定(4 $^{\circ}$ C): 置于 1%锇酸浸泡; 脱水(4 $^{\circ}$ C): 再入 1:1(包埋液: 环氧丙烷) 浸泡 2 h, 2:1(包埋液: 环氧丙烷) 浸泡过夜; 包埋。标本先半薄切片定位, 然后超薄切片, 电镜随机摄取放大 10 000 倍的神经突触超微照片。应用 Simple-PCI 图像分析系统, 选定测量参数计算突触数量, 突触界

面曲率, 突触后致密区宽度及突触间隙。

7. 免疫组化染色: 利用免疫组化技术检测大鼠血肿周围神经组织中神经突触相关蛋白 Shank1、Nestin 的表达。脑组织石蜡包埋, 切片。免疫组化检测(ABC 法)。光学显微镜下观察, 棕黄色细胞为阳性表达。应用 Simple-PCI 图像分析系统, 每张切片随机选取 6 个 200 倍视野, 测定阳性细胞个数, 细胞总数, 计算平均值。

8. 统计学分析: 利用 SPSS 16.0 统计软件进行数据统计, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较采用 *t* 检验, 神经功能评分采用重复取样方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1. BMSCs 移植后大鼠神经功能评分: 术后 6 h BMSCs 移植组和模型组均出现神经功能障碍, 随着时间的推移, 模型组大鼠的神经功能评分有所降低, 但评分仍然在 2 分以上。BMSCs 移植组大鼠 BMSCs 移植后神经功能评分分值明显下降, 基本都能达到 2 分以下。见表 1。

表 1 神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d
模型组	4.0 \pm 0.02	3.7 \pm 0.07	3.5 \pm 0.03 ^a	3.0 \pm 0.06 ^a	2.6 \pm 0.06 ^a
移植组	3.9 \pm 0.01	3.8 \pm 0.04	2.4 \pm 0.02	2.1 \pm 0.01	1.0 \pm 0.04

注: 与移植组比较, ^a $P < 0.05$

2. 大鼠神经细胞透射电镜观察: 模型组(图 1)部分神经元溶解, 其余神经元结构紊乱, 细胞器数量明显减少, 残存突触水肿, 突触小泡数量减少, 突触间隙明显增大, 突触后致密区变薄; 溶酶体增多。BMSCs 移植组(图 2)神经细胞轮廓清晰, 细胞器大多较为完整, 神经元线粒体数量较多, 神经突触数量增多, 突触间隙减小, 突触后致密增厚(表 2)。

表 2 各组大鼠突触超微结构定量分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	突触界面曲率	突触	突触后致密区 (nm)	突触间隙宽度 (nm)
模型组	0.89 \pm 0.02	1.69 \pm 0.03	16.05 \pm 1.21	38.43 \pm 4.56
移植组	1.57 \pm 0.04 ^a	16.27 \pm 2.14 ^a	68.32 \pm 10.54 ^a	14.65 \pm 1.58 ^a

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$

3. 免疫组化检测: Shank1(图 3, 4)阳性表达, 棕黄色细胞为 Nestin(图 5, 6)。Nestin、Shank1 在模型组中表达量极少。与模型组比较, 治疗组 Nestin、Shank1 蛋白的阳性表达明显升高($P < 0.01$)。各组免疫组化结果见表 3。

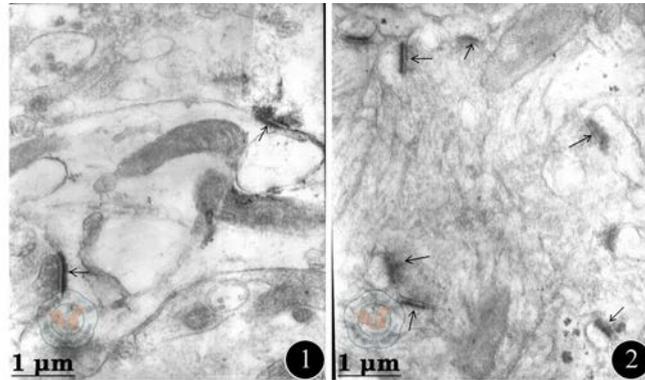


图1 模型组, ↑为神经突触 图2 移植组, ↑为神经突触

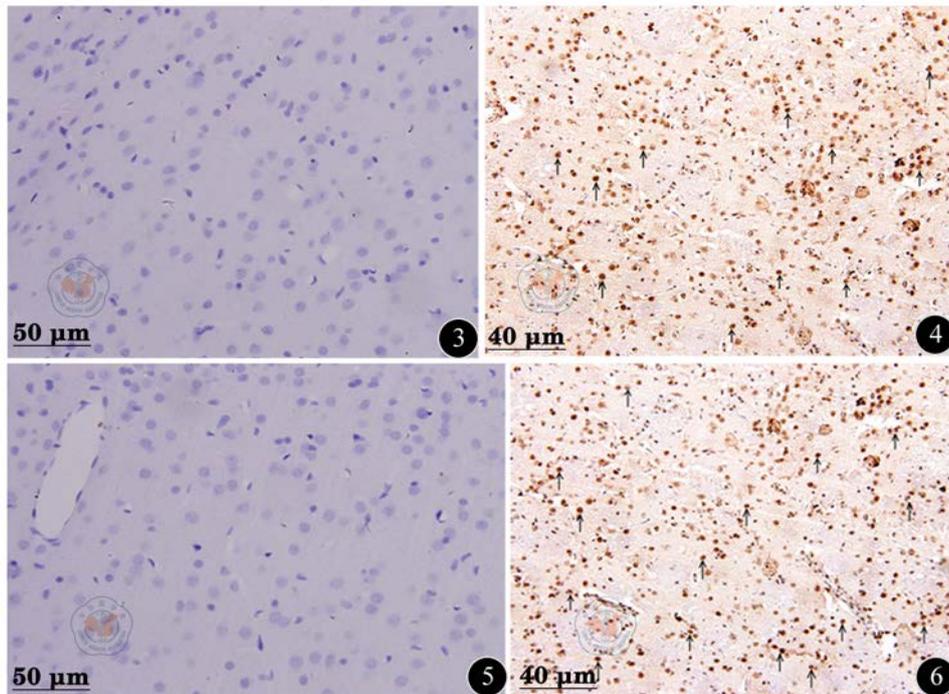


图3, 4 模型组及移植组的Shank1表达, ↑为Nestin、Shank1阳性表达细胞 图5, 6 模型组及移植组的Nestin表达; ↑为Nestin、Shank1阳性表达细胞

表3 Shank1 和 Nestin 蛋白阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Shank1	Nestin
模型组	14.33 ± 1.14	12.64 ± 0.07
移植组	75.82 ± 10.65 ^a	68.87 ± 7.46 ^a

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$

讨 论

脑出血是一种致死率及致残率很高的脑血管疾病。目前临床上采取的治疗措施效果甚微, 因此寻找新的治疗方法已是亟待解决的问题。近年来, 随着干细胞的深入研究, 通过干细胞移植治疗脑出血已获得了肯定的效果。间充质干细胞来源丰富, 具有良好的分化潜能, 在一定条件下可分化为神经组织, 体外扩增迅速, 短期内既可达到治疗所需细胞数量。研究表

明^[5-7], BMSCs 能局部和静脉注射移植治疗中枢神经系统的损伤。Jeong 等^[8]用静脉注入法将人神经干细胞移植到鼠脑出血模型中, 发现人神经干细胞在鼠大脑中存活, 并分化为神经元和神经胶质细胞, 促进了脑出血后神经功能的恢复, 证明了干细胞移植治疗脑出血是可行的。

本实验对各实验组大鼠神经功能评分表明, 造模后, 移植组和模型组大鼠出现行为和功能异常, 病变对侧肢体不同程度的瘫痪, 表现为追尾现象, 不能站立等, 其功能异常程度与病变严重程度一致。移植组与模型组比较, 3 d、7 d、14 d 后神经功能评分低于模型组 ($P < 0.05$)。说明 BMSCs 可明显改善脑出血大鼠的神经功能障碍。BMSCs 减轻大鼠神经功能障碍的机制尚不清楚, 可能与脑出血灶吸收、脑水肿减轻及

颅内压降低有关^[9]。电镜观察,模型组神经元结构紊乱,细胞器数量减少,突触数量少,突触间隙增大,其后致密区变薄。移植组神经细胞轮廓清晰,神经突触数量增多,突触间隙减小,突触后致密增厚;移植组出血灶周围神经突触相关蛋白 Shank1 表达明显增多,与模型组比较有统计学意义 ($P < 0.01$); 移植组出血灶周围可见大量 Nestin 阳性细胞表达,模型组未见大量 Nestin 阳性细胞,说明了 BMSCs 移植可保护神经突触超微结构,增强突触功能,促进突触再生。

Nakayama 等^[10]发现,神经可塑性与突触的形态和功能密切相关。突触是神经元之间的细胞连接,其是神经元之间信息传递的关节结构。突触界面曲率、数量、突触后致密区及突触间隙宽度可反映突触功能^[11-13]。本研究表明,实验组突触数量增多,界面曲率增大,突触后致密区增厚,突触间隙变窄,说明神经传导和修复能力增强,细胞代谢旺盛,功能活跃,信息传导能力增强,其更有利于促进神经递质和受体的结合,最大程度地发挥其生物学效能,有利于受损神经元修复和神经功能的恢复。综上所述, BMSCs 可促进大鼠脑出血后神经组织修复,增强神经可塑性,促进神经功能恢复。提示 BMSCs 有助于促进脑出血后损伤神经功能的恢复,增强脑组织可塑性是其可能的机制之一。

参 考 文 献

- [1] 谭来勋,徐金梅. 神经元胆固醇代谢对脑梗死后突触重塑的作用及机制的研究进展. 卒中与神经疾病, 2012, 19: 316-318.
- [2] Pereanu W, Younossi-Hartenstein A, Lovick J, et al. Lineage-based analysis of the development of the central complex of the *Drosophila* brain. *J*

- Comp Neurol*, 2011, 519: 661-689.
- [3] 程振国,孙来广,高峻红,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗脑损伤大鼠的实验研究. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10: 51-52.
- [4] 张海宇,马全瑞,张焱,等. 黄芪注射液对大鼠脑出血后神经的保护作用. 解剖学报, 2010, 41: 21-26.
- [5] 黄月,许予明,宋波,等. 骨髓间充质干细胞移植对缺血性脑损伤大鼠的作用及其机制研究. 医药论坛杂志, 2006, 27: 1-4.
- [6] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosci Lett*, 2009, 454: 43-48.
- [7] Zhang J, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29: 1166-1174.
- [8] Jeong SW, Chu K, Jung KH, et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 2003, 34: 2258-2263.
- [9] 行治国,金林,张东子,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑内出血. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10: 428-431.
- [10] Nakayama K, Kiyosue K, Taguchi T, et al. Diminished neuronal activity increases neuron-neuron connectivity underlying silent synapse formation and the rapid conversion of silent to functional synapses. *J Neurosci*, 2005, 25: 4040-4051.
- [11] Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *Neurosci Res*, 2010, 88: 1017-1025.
- [12] 周元成,吴新贵. 脑神经可塑性的研究进展. 广西中医学院学报, 2010, 13: 83-85.
- [13] 刘冬娟,韩芳,刘宁宇,等. PTSD 大鼠杏仁核神经元和突触的超微结构研究. 解剖科学进展, 2009, 15: 17-20.

(收稿日期: 2013-04-18)

(本文编辑: 戚红丹)

单泓,李建斌,刘敏,等.骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑出血后神经可塑性的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (15): 7014-7017.

中 华 临 床 医 学 会